Aus der WE Anatomie
(Geschäftsführender Direktor Professor Dr. med. E. Wüstenfeld)
der Freien Universität Berlin

Morphometrische Analyse des fetalen Mäuseskeletts am 18. Entwicklungstag

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susanne Jassim, geb. Gabrys

aus Berlin

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0052

Aus der WE Anatomie
(Geschäftsführender Direktor Professor Dr. med. E. Wüstenfeld)
der Freien Universität Berlin

Morphometrische Analyse des fetalen Mäuseskeletts am 18. Entwicklungstag

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susanne Jassim, geb. Gabrys

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. MILAN POSPISIL
Koreferent: Professor Dr. W. SCHWARZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. 5. 1975

Inhaltsverzeichnis

1. Die Maus als Versuchstier der experimentellen Teratologie.....1
2. Material und Methoden.....5
3. Ergebnisse.....8
4. Tabelle 1 13
5. Diskussion der Befunde.....15
6. Zusammenfassung.....16
7. Literatur.....18
8. Tabelle 2 20
9. Bildmaterial.....21

1. Die Maus als Versuchstier der experimentellen Teratologie.

Zur Vermeidung teratogener Risiken durch eine medikamentöse Therapie der menschlichen Schwangerschaft sind Versuchstiere zur Testung von Arzneimitteln unumgänglich. Ungelöst bis heute ist hierbei das Problem der artspezifischen Reaktionen dieser Tiere. Da man weiß, dass bestimmte Tierarten in der Schwangerschaft auf bestimmte Pharmaka nicht oder nur auf völlig unphysiologische Dosierungen mit Mißbildungen der Nachkommen reagieren, waren nach der Thalidomid-Katastrophe Primaten als teratologische Versuchstiere in den Vordergrund des Interesses gerückt. Jedoch ließen sich auch hier Unterschiede im Verhalten gegenüber teratogenen Substanzen nachweisen. Dazu kommen noch die Probleme der Haltung und Kosten. Deshalb sind die klassischen Versuchstiere Ratte und Maus, zunehmend ergänzt durch Untersuchungen an Kaninchen, in ihrem Wert als teratologische Versuchstiere bestätigt worden. Nicht zuletzt benötigt die pharmazeutische Industrie diese Tiere zum teratologischen Screening ihrer neuen Präparate und Substanzen. " Rodents should not be abandoned for drug testing as long as it is not established that embryos of other animal species react more like human embryos "(TUCHMANN-DUPLESSIS 1972).

Dieses Screening folgt, mit meist nur geringer Modifizierung, dem von WILSON(1964) vorgeschlagenen Schema. Bei Variation von Dosis- und Applikationstermin werden hierbei die durch Kaiserschnitt entbundenen Embryonen in Beziehung zu ihrer intrauterinen Position nach Feststellung von Resorptions-

stellen gewogen und durch Inspektion auf grobe äußere und innere Mißbildungen untersucht. Die grundsätzliche Teratogenität einer Substanz für eine Spezies sowie grobe Dosis-Wirkungs-Beziehungen sind auf diese Art und Weise erfaßbar. Mit dieser Technik sind bei der Maus eine große Anzahl der verschiedensten Substanzen und Pharmaka sowie ionisierende Strahlen untersucht worden.

Über das reine "qualitative" Screening hinaus verfolgt die experimentelle Teratologie bei ihrer Suche nach den teratogenen Wirkungsmechanismen Dosis-Wirkungs-Beziehungen im Schwellenbereich potentiell wirksamer Substanzen (NEUBERT D., MERKER H.J., KÖHLER E., KROWKE R., BARRACH H.J.: Biochemical Aspects of Teratology in: Advances in Biosciences 6, 575-620, 1970). Hierbei sind nur schwach ausgeprägte, äußerlich sichtbare Anomalien (=Mißbildungen) oder aber quantitative Reduktionen normaler Körperelemente (als Vorstufe grober Mißbildungen bzw. als sog. Mikrosymptom) zu erwarten. Wegen der technisch relativ leichten Feststellbarkeit stehen Untersuchungen am Skelett im Vordergrund.

Während bisher allein das Fehlen oder die deutliche Hypoplasie von Skeletstücken zur Beurteilung herangezogen wurden, verspricht gerade die exakte Erfassung von Größenverhältnissen eine bessere Quantifizierbarkeit der Wirkungen. Die Kenntnisse solcher Veränderungen sind nicht zuletzt für das Problem der Substanzkombination (Addition, Potenzierung) von großer Bedeutung. In der morphometrischen Arbeitsgruppe (M. POSPISIL) des Sonderforschungbereiches "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonal-Pharmakologie)" der deutschen Forschungsgemeinschaft an der Freien Universität Berlin werden daher systematische biometrische Untersuchungen durchgeführt,

in denen an Ratten-, Mäuse- und Kaninchenembryonen der hier gehaltenen Stämme die Einflüsse teratogener und potentiell teratogener Noxen und Kombinationen solcher Substanzen vor allem in Schwellenbereichen untersucht und über morphometrische Analysen erfaßt werden sollen. Darüberhinaus kann vermutet werden, daß neben den quantitativ erfaßbaren und damit statistisch gut auswertbaren Veränderungen der Knochen auch qualitative Veränderungen im Bereich der Feinstruktur Aussagen über Mikroeffekte zulassen. Solche Untersuchungen werden ebenfalls in der Anatomie durchgeführt (MERKER) und sollen deshalb ebenfalls parallel zu den biometrischen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Bei Durchsicht der Literatur fiel auf, daß bis auf eine allgemeine Beschreibung (WIRTSCHAFTER 1960) keine für unser Vorhaben brauchbaren quantitativen Angaben über die normale Entwicklung des Mäuseskeletts vorliegen. OTIS & BRENT (1954) haben ihre Daten über die Gesamtentwicklung der Maus bis zum Tag 16,5 der intrauterinen Entwicklung mit Literaturangaben über die Entwicklung des Menschen in Beziehung gesetzt. Hier fehlen uns leider die Angaben über die Entwicklung bis zum Tag 18 sowie quantitative Daten. FRITZ & HESS (1970) haben die Ossifikation des Skeletts von Ratte und Maus unter besonderer Berücksichtigung der perinatalen Periode beschrieben. Einige aus dieser Arbeit brauchbaren Angaben sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Aus den intensiven Bemühungen der Genetiker (GRÜNEBERG 1963) wissen wir, daß der Einfluß des genetischen Hintergrundes, wie er sich in den einzelnen Inzuchtstämmen darbietet, besonders in der Entwicklung des Mäuseskeletts stark zum Ausdruck kommt (zur Teratologie des Skeletts vgl. MILLEN & WOOLMAN 1963). Außer

dem Schädel sind besonders Extremitäten für die Teratologie interessant(Mißbildungen z.B. durch Galactoflavin vgl. KALTER & WARKANY 1957).
Für die Verhältnisse im Bereich der Feinstruktur liegen zahlreiche Arbeiten über Einzelprobleme vor, z.B. über die Bildung der Interzellularsubstanz, Knorpelverkalkung, Abbau des Knorpels, Bildung des Osteoids, Mineralisation (Lit. siehe MERKER 1973). Sie sind aber speziell für die Maus noch nicht in einer zeitlichen Frequenz geordnet worden. Nur über die Ratte liegen vergleichbare Untersuchungen bei der desmalen Ossifikation am Schädeldach, der enchondralen Ossifikation an Röhrenknochen und dem Sonderfall Mandibula vor. (WODTKE 1972, CREDNER 1972).

Die Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit bestand darin, als Grundlage für spätere teratologische Studien an unserem Inzuchtsstamm NMRI
1. an Serienschnitten die normale histologische Differenzierung der Mäuseextremität zu verfolgen und
2. am 18. Tag der intrauterinen Entwicklung eine Morphometrie der Skelettelemente an präparierten Feten unter besonderer Berücksichtigung der Streuung der Werte vorzunehmen.
3. Feinstrukturelle, d.h. elektronenmikroskopische Kriterien zu besitzen, die auch in diesem Bereich eine Beurteilung der Skelettentwicklung ermöglichen.

2. Material und Methoden

Die Muttertiere des Mäusestammes NMRI wurden unter konstanten Bedingungen (Raumtemperatur 25°C, Luftfeuchte 5o - 6o %) bei einem veränderten Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Hierbei wurden die Versuchstierräume zwischen 12 Uhr mittags und 4 Uhr morgens beleuchtet, um die optimale Paarungszeit, die durch Licht gesteuert wird, in die Arbeitszeit fallen zu lassen.
Die Paarung der Tiere erfolgte zwischen 8 und 1o Uhr am Vormittag. Nach der Paarung wurde in Vaginalabstrichen das Vorhandensein von Spermien untersucht. Die 24-Stunden-Periode, die bei positivem Spermiennachweis sich an 9 Uhr anschloß, wird (sog. "Berliner Zählung") als Ta_0 Null bezeichnet.
Die Entnahme von Embryonen zu den Serienschnitten erfolgte an den Tagen 14, 15, 16, 17 und 18 jeweils um 9 Uhr.
Die Herstellung der Serienschnitte erfolgte von BOUIN-fixiertem Material nach Paraplasteinbettung. Die Schnitte wurden mit H.-E. Azan, Toluidinblau bei verschiedenem pH, PAS und, wenn nötig, besonderen Spezialfärbungen (z.B. COSSA, alkalische Phosphatase) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit Zeiss-Photomikroskop Standard Universal, Primärvergrößerung 2o und 4ofach.
Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung erfolgte die möglichst schnelle Fixierung in einem KARNOVSKI-Gemisch aus 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer (o,1M bei pH 7,2). Die Foeten wurden sofort in die Fixierlösung eingebracht und hier in die gewünschten Teile zerlegt. Einbettung: Nach Acetonentwässerung in Micropal (Fa. Ferate Berlin). Schnitte: LKB- und REICHERT-Mikrotome. Aufnahme: Siemenselmiskope I Ia und 1o1. Kontrastierung: Uranylacetat, Bleicitrat.

Die Aufhellung der Feten und die Anfärbung der Skelettelemente erfolgt in Anlehnung an DAWSON (1926) unter Berücksichtigung der Modifikationen von EVANS (1948), STAPLES & SCHNELL (1964), BURDI (1965), JENSH & BRENT (1966) sowie BURDI & FLECKER (1968) nach folgender Technik:

1. Fixieren der frei-präparierten Feten für eine Woche in 1o %iger Formollösung.
2. Durch einen Bauchschnitt werden vorsichtig Bauchhöhle und Thorax entleert (Vorsicht vor Verletzungen von Sternum und Wirbelsäule !).
3. Einen Tag einlegen in Leitungswasser.
4. Eine Woche einlegen in eine Mischung aus 1 Volumenteil Äther mit 3 Volumenteilen vergälltem absolutem Alkohol.
5. Anfärben mit Alizarin:
   In 1o %iger KOH werden 6 mg Alizarin/1ooo ml gelöst. Die blau-violette Lösung wird durch ein feines Sieb filtriert über die Embryonen gegossen. Wird die Lösung nach 12-24 Stunden braun, muß sie erneuert werden. Je nach Größe der Embryonen dauert die Färbeprozedur 3 - 5 Tage.
6. Die Feten werden einige Stunden (über Nacht) in Leitungswasser gewässert.
7. Nach einigen Stunden Aufbewahrung in einer Lösung aus 1 Teil Benzylalkohol und 2 Teilen absolutem Alkohol und 2 Teilen Glycerin werden die Präparate in reinem Glycerin aufbewahrt. Technisches Glycerin muß hierzu durch Glaswolle filtriert werden.

An 1oo Feten wurden folgende Skelettelemente gemessen:

Ossa capitis: Os intraparietale (Länge A, Breite A'),
Humerus (F/F'),
Ulna (G/G'),

Radius (H/H'),
Femur (N/N'),
Tibia (O/O'),
Fibula (P/P').

Bei den langen Röhrenknochen bedeuten die Paarungen jeweils rechts/links. Diese Seitenpaarungen gelten auch für die paarigen Knochen, deren Ossifikation ermittelt wurde. Es sind dies:

Sternum (B),
Costae (C),
Scapula (D/D'),
Clavicula (E/E'),
Carpus (J/J'),
Metacarpalia (K/K'),
Phalanges der Extremitas superior (L/L'),
Coxae (M/M'),
Tarsus (Q/Q'),
Metatarsalia (R/R'),
Phalanges der Extremitas inferior (S/S'),
Columna vertebrarum:
Cervicales (T), Thoracales (U), Lumbales (V),
Sacrales (W), Caudales (Z).

An 5o Feten wurden zusätzlich Maße des knöchernen Gaumens (I, II und III; vgl. Tabelle 1) gewonnen.

Berechnet wurden die Mittelwerte und die Streuung der Mittelwerte (absolut und prozentual).

3. Ergebnisse

Histogenese der Extremität der Maus

A. Lichtmikroskopisch

Die Histogenese der Extremitäten bei Mäusen beginnt am Tag 9 mit lichtmikroskopisch faßbaren Extemitätenknospen, die noch mit einem relativ lockeren Mesenchym ausgefüllt sind. In den folgenden Tagen vermehren sich diese Zellen und es entsteht ein typisches, dichtgepacktes Blastem. Im Randbereich ist das Blastem weniger dicht gepackt. Hier finden sich weite Blutgefäße, besonders an der Spitze fällt deutlich der große Randsinus auf. Das Epithel ist zweischichtig mit einer oberflächlichen dünnen, endothelähnlichen Lage, dem Periderm. An der Spitze wird dann das Epithel mehrschichtig und es bildet sich die sog. Randleiste.
Am späten Tag 11 beginnt im Zentrum des Blastems die Auflockerung des dichten Zellverbandes durch Sekretion der mesenchymalen Interzellularsubstanz. Am Tag 12 und 13 grenzen sich die Bezirke mit reichlich Interzellularsubstanz deutlich gegen die Umgebung ab, es ist also embryonaler, hyaliner Knorpel entstanden. Gleichzeitig wachsen die Knorpelstücke und bekommen ihre typische Form. Bei der embryonalen Knorpelentstehung in den Extremitäten ist ein deutlicher proximo-distaler Reifungsgradient zu beobachten. Zuerst wird also der Knorpel angelegt, aus dem Humerus oder Femur entstehen und zuletzt der Knorpel, aus dem die Phalangen hervorgehen.
Am Entwicklungstag 14 wird die Extremitätenoberfläche von einem wenig differenzierten dreischichtigen Epithel überzogen, das von Mesenchym und einigen Kapillaren un-

terschichtet ist. In der Mitte der Extremität finden sich fertig ausgeprägt die Skeletstücke aus embryonalem hyalinem Knorpel. Eine Aufteilung in vier Strahlen ist bereits deutlich erkennbar. Die Knorpelgewebemassen sind von verdichtetem Mesenchym umgeben, aus dem heraus sich quergestreifte Muskelfasern differenzieren; am weitesten ist der Prozeß im Oberarmbereich fortgeschritten. In der Anlage der Ulna sind Vorstadien der späteren Ossifikation in Form von hypertrophischem (Blasen-)-Knorpel sichtbar. Die äußere Gestalt der vorderen Extremität ist deutlich zu erkennen.

Die Extremitäten 15 Tage alter Mäusefeten (Abbildung 1; Bildanhang) sind deutlich vergrößert. Das Oberflächenepithel hat jetzt 3 - 4 Schichten, die noch immer keine Differenzierung in Richtung Verhornung aufweisen. Das unterliegende Mesenchym erscheint locker und zeigt an einigen Stellen Verdichtungen. Vorstadien der Ossifikation - hypertrophischer Knorpel - sind jetzt deutlich an Humerus, Radius, Ulna sowie an den Metacarpalia zu sehen. Einige Muskelzüge sind fast komplett ausdifferenziert.

Der Entwicklungstag 16 (Abbildung 2; Bildanhang) zeigt den Beginn der Differenzierung des Oberflächenepithels mit dem ersten Auftreten von Keratohyalingranula mit einer Zunahme der Schichtenzahl. Einzelne Papillen sind angelegt und an einigen Stellen dringen epitheliale Zapfen in das unterliegende Corium ein. Die Oberarmknochen zeigen bereits voll ausgebildetes Knochengewebe und Diaphysen mit deutlicher Knochenmanschette. Zwischen den Knochenbälkchen ist ein zellreiches Knochenmark sichtbar. Die späteren Gelenke sind deutlich umrissen. In den Schnitten fallen zahlreiche Erythrozyten im Knochenmark und um den sich bildenden Knochen in den dort erweiterten Gefäßen auf.

Am Entwicklungstag 17 (Abbildung 3; Bildanhang) ist das Oberflächenepithel voll differenziert mit deutlicher Schichtung. Das starke Stratum corneum bildet charakteristische Fältchen an der Oberfläche der Extremität; im Stratum granulosum ist der Beginn der Keratinisierung erkennbar. Subepithelial sind zahlreiche mit Blut gefüllte Gefäße vorhanden. Die Diaphysen der Knochen haben sich verlängert - hier führt bereits der Abbau knöcherner Trabeculae zur Ausbildung echter Markhöhlen mit bleibendem Knochenmark.
Am 18. Entwicklungstag der Maus (Abbildung 4; Bildanhang) ist die äußere Form der Extremitäten deutlich ausgebildet. Das Oberflächenepithel ist nun deutlich gegliedert in

Stratum basale
Stratum spinosum
Stratum granulosum und
Stratum corneum.

Zahlreiche solide Epithelzapfen haben sich in das Corium eingesenkt. Die Endphalangen haben bereits Krallen ausgebildet. Während die Handwurzelknochen als zuletzt verknöcherndes Extremitätenelement noch knorpelig angelegt sind, sind Ossifikationspunkte jetzt auch in den Phalangen sichtbar. Die Muskelzüge sind deutlich ausdifferenziert. Aus der Analyse der Histogenese der Extremität geht deutlich hervor, daß der Entwicklungsstand am 18. intrauterinen Tag für eine morphometrische Analyse der Skelettentwicklung brauchbar ist.

B. Elektronenmikroskopisch

a) Zellen. Die Variabilität und Polymorphie der zahl-

reichen Zelltypen, die für Bildung, Sekretion und Reifung der Interzellularsubstanz im Bereich des sich entwickelnden Skelets verantwortlich sind, macht eine Verwertung ihrer Feinstruktur im Rahmen eines Screening-Systems wenig aussichtsreich. Auf eine Beschreibung der Zellen soll deshalb hier verzichtet und auf teilweise bereits vorliegende Ergebnisse verwiesen werden (MERKER 1973, 1973 a).

b) Interzellularsubstanz (IZS). Folgende Stadien lassen sich elektronenmikroskopisch besonders eindeutig erfassen und sind deshalb zur reproduzierbaren Beurteilung im Rahmen eines Screening-Systems gut beurteilbar.

α. Die IZS des embryonalen hyalinen Knorpels besteht aus 100 bis höchstens 200 Å dicken Filamenten ohne Querstreifung. Sie verlaufen vorwiegend einzeln und regellos. Nur in der Nähe der Knorpelzellen findet sich eine selektiv unipolare Anordnung;und in der Interterritorialsubstanz liegen manchmal einzelne kleine Bündel aus 3 - 10 parallel verlaufenden Filamenten. An den kollagenen Filamenten und auch dazwischen liegen 300 - 500 Å dicke Granula, von denen aus feine Filamente ausstrahlen. Es handelt sich um Chondroitin-Sulphat-Proteoglykane.

β. Vom frühen Tag 15 an lagern sich in die IZS des Knorpels Apatitkristalle ein (640 Å x 60 Å x 30 Å). Zunächst finden sich diese Strukturen in Form von kleinen Haufen mit einem Durchmesser von 0,3 - 1 µm bei regelloser Lagerung. Diese Kalkdrusen wachsen. Jetzt findet sich an der Peripherie eine vorwiegend radiäre Lagerung bei einer extremen Elektronendichte im Zentrum. Die Drusen fließen dann zusammen und bilden teilweise traubenförmige Strukturen.

γ. Gleichzeitig beginnt sich im diaphysären Bereich

die desmale perichondrale Knochenmanschette zu bilden. Dabei werden zunächst 250 - 350 Å dicke quergestreifte Fibrillen regellos oder manchmal in gebündelter Form, d.h. als verflochtene oder parallelverlaufende Fasern abgelagert. Auf dem Boden dieser Textur lagern sich die Apatit-Kristalle in der beschriebenen drusenartigen Form ab, vergrößern sich und fließen zusammen. Parallel dazu vermehren und verdicken sich die Fibrillen, die aber wegen der Maskierung durch die Apatit-Kristalle nicht mehr sicher zu beurteilen sind.

δ. Die Bildung des Ersatzknochens beginnt mit der Ablagerung noch dickerer Fibrillen (300 - 450 Å), die von Anfang an in breiten, sich verflechtenden Fasern oder Lagen gebündelt sind. Die Mineralisation zeigt sofort eine enge räumliche Beziehung zum Kollagen. Die Apatit-Kristalle ordnen sich streng parallel zu den Fibrillen an und zeigen sogar in einzelnen Bildern eine etagenartige Ausrichtung entsprechend dem Querstreifungsmuster. Bei vollständiger Mineralisation ist auch hier in den üblichen Routineschnitten wegen der extremen Elektronendichte keine Strukturerkennung mehr möglich.

Tabelle 1

Morphometrische Skelettdaten 18 Tage alter Mäusefeten.
(Mittelwerte aus loo Feten)

Skelettelemente (dx = dexter; sn = sinister)			Mittelwerte (OP = Ossifikationspunkte)	Streuung total	Streuung %
Ossa capitis:					
intraparietale	Länge	A	4,5 mm	± 0,18 mm	± 4,0
	Breite	A'	1,5 mm	± 0,11 mm	± 7,4
Sternum		B	6 OP	keine	0
Costae		C	13 Stück	keine	0
Extremitas superior:					
Scapula	dx	D	vorhanden	---------	-----
	sn	D'	vorhanden	---------	-----
Clavicula	dx	E	vorhanden	---------	-----
	sn	E'	vorhanden	---------	-----
Humerus	dx	F	2,6 mm	± 0,13 mm	± 5,0
	sn	F'	2,6 mm	± 0,12 mm	± 4,9
Ulna	dx	G	2,7 mm	± 0,16 mm	± 5,7
	sn	G'	2,7 mm	± 0,16 mm	± 5,7
Radius	dx	H	2,2 mm	± 0,16 mm	± 7,0
	sn	H'	2,2 mm	± 0,16 mm	± 7,1
Carpus	dx	J	nicht vorh.	---------	-----
	sn	J'	nicht vorh.	---------	-----
Metacarpalia	dx	K	4 OP	keine	0
	sn	K'	4 OP	keine	0
Phalanges	dx	L	11,7 OP	± 1,16 OP	± 9,9
	sn	L'	11,7 OP	± 1,05 OP	± 9,0
Adnotata (5o Feten)					
Breite des knöchernen Gaumens links		I	0,20 mm	± 0,05 mm	± 23,8
Abstand zwischen		II	0,15 mm	± 0,08 mm	± 53,6
Breite des knöchernen Gaumens rechts		III	0,21 mm	± 0,03 mm	± 16,6

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Morphometrische Skelettdaten 18 Tage alter Mäusefeten.
(Mittelwerte aus 100 Feten)

Skelettelemente (dx = dexter; sn = sinister)			Mittelwerte (OP = Ossifikations-punkte)	Streuung total	%
Extremitas inferior:					
Coxae	dx	M	vorhanden	--------	-----
	sn	M'	vorhanden	--------	-----
Femur	dx	N	1,9 mm	± 0,14 mm	± 7,0
	sn	N'	1,9 mm	± 0,14 mm	± 7,0
Tibia	dx	O	2,3 mm	± 0,15 mm	± 6,7
	sn	O'	2,3 mm	± 0,16 mm	± 6,8
Fibula	dx	P	2,1 mm	± 0,16 mm	± 7,4
	sn	P'	2,1 mm	± 0,16 mm	± 7,4
Tarsus	dx	Q	0,88 OP	± 0,59 OP	± 67
	sn	Q'	0,82 OP	± 0,54 OP	± 66
Metatarsalia	dx	R	5 OP	keine	0
	sn	R'	5 OP	keine	0
Phalanges	dx	S	10,3 OP	± 1,67 OP	± 16
	sn	S'	10,3 OP	± 1,63 OP	± 15
Columna vertebrarum:					
Cervicales		T	7 Stück	keine	0
Thoracales		U	13 Stück	keine	0
Lumbales		V	6 Stück	keine	0
Sacrales		W	4 Stück	keine	0
Caudales		Z	8 Stück	±1,28 St.	± 16

4. Diskussion der Befunde

Die gering ausgeprägte Streuung der Knochenmaße und der Zahl der Ossifikationszentren am Tag 18 der intrauterinen Entwicklung des Mäuse-Inzuchtstammes NMRI, das Fehlen von Rechts-/Links-Unterschieden sowie die an den Serienschnitten verfolgte gute histologische und elektronenmikroskopische Erfassung der Differenzierung der Extremität lassen quantitative und qualitative Analysen als brauchbares Instrument zur Bestimmung auch schwacher teratologischer Effekte erscheinen. Dies gilt nicht für die durch größere Variation gekennzeichneten Maße des knöchernen Gaumens sowie für die Ossifikation der distalen Extremitätenabschnitte und der kaudalen Wirbelsäule. Andererseits sind diese Elemente, charakterisiert auch durch eine starke Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Tiere, zur Erfassung von teratogenen Einflüssen in der Phase nach vollzogener Organogenese prädestiniert.
Eine Störung der Ossifikation durch interferierende Substanzen, die zwischen Tag 16 und 17 appliziert werden, müßte an diesen Abschnitten zu Mißbildungen führen. Substanzen, die nach dem WILSON-Schema um Tag 11 appliziert werden und mit der Ausbildung des Skeletts in Wechselwirkung treten, könnten, abgesehen von Aplasien, in ihren Wirkungen quantitativ durch Längenmessungen der Röhrenknochen erfaßt werden.
Daneben sind als weitere Indikatoren die Ossifikationen der kleineren Elemente(Wirbelkörper, Sternebrae, Costae) verwendbar.
Vergleichbare Angaben aus der Literatur über die Knochenmaße (Abbildung 5) stehen uns nicht zur Verfügung und wären vermutlich wegen stammesspezifischer Differenzen und Unterschiede in der Haltung der Tiere nur als grobe Anhaltspunkte brauchbar. Als Vergleich für die Bestimmung der Ossifikation stehen jedoch Angaben von FRITZ & HESS (1970) an NMRI-Mäusen

bereit, die in der Tabelle 2 zusammengefaßt sind. Auch diese Werte sind nur bedingt als Vergleich nutzbar. Einige Gegensätze fallen auf. FRITZ & HESS beschreiben an ihren Mäusefeten noch eine ausgeprägte Streuung der Ossifikation am Sternum sowie eine geringere Streuung im zervikalen Abschnitt der Wirbelsäule. Wir möchten diese Unterschiede auf Materialdifferenzen zurückführen. Wie diese Autoren finden wir eine vollständige Ossifikation am 18. Entwicklungstag am Metacarpale und Metatarsale und ausgesprochene Abweichungen an den Phalangen von Hand und Fuß.

5. Zusammenfassung

An Serienschnitten zwischen Tag 14 und 18 der intrauterinen Entwicklung von Mäuseembryonen wurde die Entwicklung der Extremität licht- und elektronenmikroskopisch verfolgt und an Abbildungen beschrieben. Durch Aufhellung mit Alizarin angefärbte Mäusefeten (n = 100) wurden morphometrisch bezüglich ihrer Skelettmaße und ihrer Skelettentwicklung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und den Abbildungen 5 und 6 dargestellt. Als Grundlage für eine teratologische Feinanalyse können Messungen der langen Röhrenknochen verwendet werden, da die Längen ohne bemerkenswerte Streuung und bei fehlenden Rechts-/Links-Unterschieden sehr konstant sind. Diese Konstanz spricht auch für die Stabilität des verwendeten Mäusestammes NMRI. Maße des Gaumens und die Ossifikation der kaudalen Wirbelsäule sowie der distalen Extremitätenabschnitte sind für die Erfassung von in der Frühschwangerschaft gesetzten Schäden wegen der starken Streuung ihrer Werte nicht brauchbar. Hier

scheinen aber genetische Schäden und teratogene Einflüsse in der Spätschwangerschaft ausgeprägt möglich zu sein.

6. Literatur

BURDI, A. R.: Stain Technol. 40 (1965), 45 - 48
Toluidine blue - alizarin red S staining of cartilage and bone in whole - mount skeletons in vitro.

BURDI, A. R.; FLECKER, K.: Stain Technol. 43 (1968), 47 - 48
Differential staining of cartilage and bone in the intact chick embryonic skeleton in vitro.

DAWSON, A.B.: Stain Technol. 1 (1926), 123 - 124
Note on the staining of the skeleton of cleaned specimens with alizarin S.

EVANS, H.E.: Turtox News 2 (1948), 42 - 47
Clearing and staining small vertebrates, in toto, for demonstrating ossification.

FRITZ, H., HESS, R.: Teratology 3 (1970), 331 - 338
Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period.

GEBHARDT, D. O. E.: Teratology 3 (1970), 273 - 278
The embryolethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos.

GRÜNEBERG, H.:The pathology of development. A study of inherited skeletal sisorders in animals. Oxford, 1963.

JENSH, R. P., BRENT, R. L.: Stain Technol. 41 (1966), 179 - 183
Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone.

JONEJA, M., UNGTHAVORN, S.: Teratology 2 (1969), 235 - 240
Teratogenic effects of vincristine in three lines of mice.

KALTER, H., WARKANY, J.: J. exper. Zool. 136 (1957), 531 - 553
Congenital malformations in inbred strains of mice induced by riboflavin - deficient, galactoflavin - containing diets.

KREYBIG, TH. von: Experimentelle Preanatal-Toxikologie. (Arzneimittel-Forsch., 17. Beiheft). Aulendorf i. Württ. 1968

MILLEN, J.W., WOOLMAN, D. H. M.: Proceed. Europ. Soc. for the Study of Drug Toxicity, 1 (1963)
Effects of drugs on the foetus.
Congenital malformations of the skeletal system.pp. 9 - 24

NEUBERT, D., MERKER, J., KÖHLER, E., KROWKE, R., BARRACH, H.J.: Advances in Biosciences 6 (1970), 575 - 620
Biochemical Aspects of Teratology

OTIS, E. M., BRENT, R.: Anat. Rec. 120 (1954), 33 - 64
Equivalent ages in mouse an human embryos.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H.: Teratology 5 (1972), 271 - 286
Teratogenic drug screening. Present procedures and requirements.

WILSON, J.G. :Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals.
In: Teratology: Principles and Techniques (eds. WILSON & WARKANY) - 1964, 262 - 275

WIRTSCHAFTER, Z. T.: The genesis of the mouse skeleton. A laboratory atlas.
Thomas, Springfield, III. 1960

WODTKE, A.: Inaug. Dissert., Berlin 1972
Mineralisation des Vorknorpels.

Tabelle 2

Ossifikation des pränatalen (d 18) Skeletts von NMRI-Mäusefeten (nach FRITZ & HESS 1970)

Skeletteil	Ossifikation (%)		
	normal	inkomplett	abnorm
Columnae vertebrales			
cervicales	91,5		
caudales	88,7		
Sternebra 1	100	0,5	
" 2	99,5	4,6	
" 3	) 99,7	5,3	ca. 6
" 4		10,7	
" 5	) 99,3	62,5	
" 6		17,4	
Extremitas superior			
Metacarpale V	100		
Phalanges I, 2	93,1		
" I, 3+4	98,6		
" I, 5	82,4		
Phalanges III, 1	77,5		
" III, 2-4	80,6		
" III, 5	52,0		
Extremitas inferior			
Metatarsale V	100		
Phalanges I, 2-4	91,3		
" I, 5	79,4		
Phalanges III, 2-4	89,8		
" III,5	67,9		

B i l d m a t e r i a l

Abb. 1. Mäuseembryo Tag 15.
Knorpelige Knochenanlagen mit
beginnender Ossifikation:
hypertrophischer Knorpel.
Anfang der Muskeldifferenzierung.
Mittlere Vergrößerung

Abb. 2. Mäuseembryo Tag 16.
Epidermis mit beginnender Verhornung; in den Zehengliedern Knochenbildung.
Mittlere Vergrößerung.

Abb. 3. Mäuseembryo Tag 17.
Ossifikation in vollem Gange.
Im Mesenchym deutlich dünnwandige
Venen.
Mittlere Vergrößerung.

Abb. 4. Mäuseembryo Tag 18.
Vordere Extremität: Deutliche Verknöcherung der Mittelhandknochen. Die Mm. interossei zeigen eine typische doppelte Fiederung.
Mittlere Vergrößerung.

Abbildung 5 (vgl. Text)

Abbildung 5 (vgl. Text)

Abbildung 6 (vgl. Text)

Abbildung 6 (vgl. Text)

Abb. 7. Mäuseembryo Tag 11.
Extremitätenknospe. Ektoderm
an der Oberfläche, darunter
lockeres Mesenchym und verdich-
tetes Blastem.
Vergrößerung 1 : 2000

Abb. 8. Mäuseembryo Tag 15.
Knorpelzellen, Perichondrium an der Knorpeloberfläche, IZS zwischen den Zellen, Mesenchym.
Vergrößerung 1 : 4000

Abb. 9. Mäuseembryo Tag 15.
Typische Knorpelzellen mit Golgiapparat, EPR und viel Glykogen. In IZS Kollagenfilamente und Mukopolysaccharidgranula.
Vergrößerung 1 : 19 000

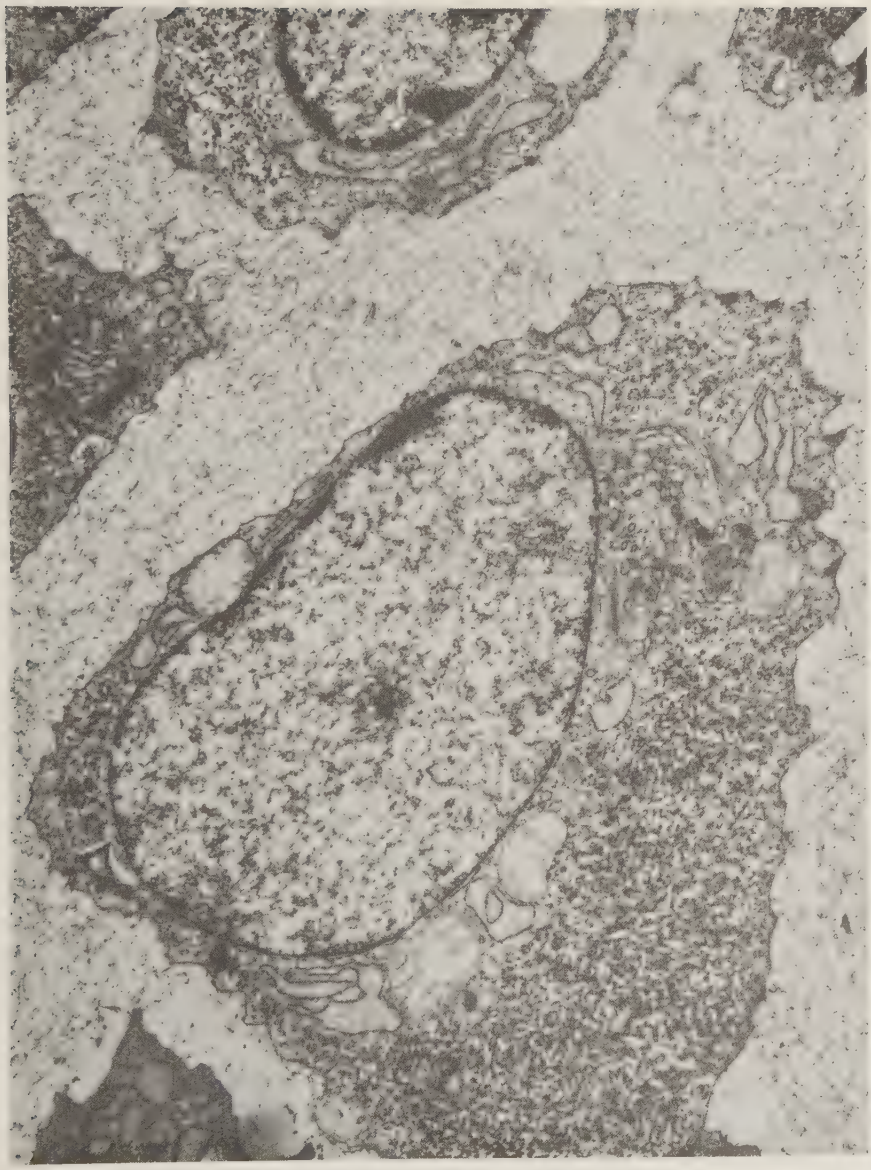

Abb. 10. Mäuseembryo Tag 17.
Beginnende perichondrale Mineralisation. Osteoblasten und kollagene Fibrillen.
Vergrößerung 1 : 20 000

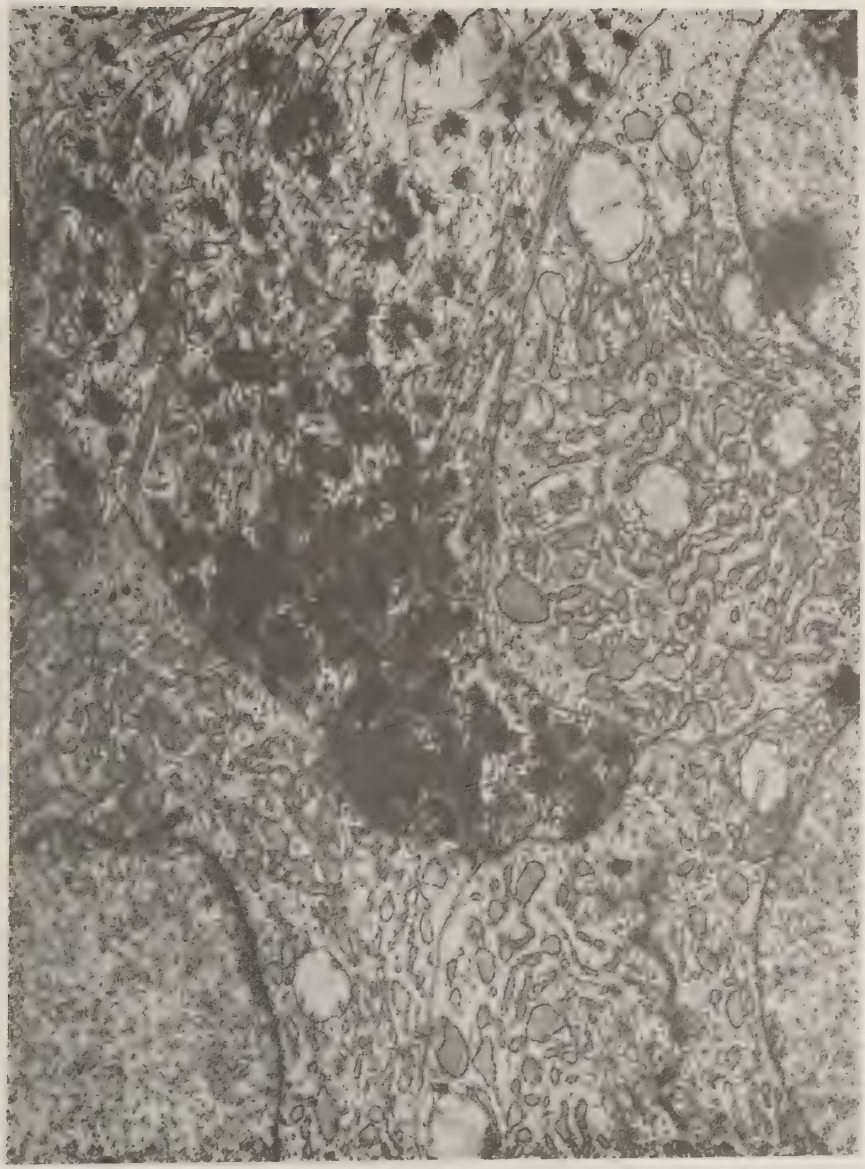

Abb. 11. Mäuseembryo Tag 17.
Apatitkristalle, kollagene Fasern
Vergrößerung 1 : 60 000

Abb. 12. Mäuseembryo Tag 19.
Perichondrale Mineralisation,
zusammengefaßte Apatitaggregate.
Vergrößerung 1 : 20 000

Abb. 13. Mäuseembryo Tag 19.
Homogener mineralisierter Bezirk aus der perichondralen Knochenmanschette mit einzelnen Apatitaggregaten am Rand.
Vergrößerung 1 : 60 000

Abb. 14. Mäuseembryo Tag 18.
Enchondrale Mineralisation;
kollagene Fibrillen und
Apatitkristalle.
Vergrößerung 1 : 80 000

Herrn Prof. Dr. med. M. Pospisil danke
ich für die Überlassung des Themas
"Morphometrische Analyse des fetalen
Mäuseskeletts am 18. Entwicklungstag.

L e b e n s l a u f

24. April 1941 geboren in Müsen, Krs. Siegen
Vater: Amtsgerichtsrat Franz Gabrys, gefallen 1941
Mutter: Elisabeth G., geb. Parthesius
1948 Einschulung in Dahlbruch, Krs. Siegen, kath. Volksschule
1951 Neusprachliches Mädchengymnasium Stift Keppel
1957 Abbruch der Schulausbildung wegen Krankheit
1960 Schule für med.-techn. Assistentinnen in Berlin
1962 Examen für med.-techn. Assist., Senat von Berlin
7 Monate Praktikum in der Biochemie der Scheringwerke, Berlin
1963 Fortführung der abgebrochenen Schulausbildung bei Gabbes Lehranstalten, Berlin
1964 Externes Abitur, Senat von Berlin
1964 12.11., Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Fachrichtung Human-Medizin
1965 4.10., Vorphysikum, FU Berlin
1968 2.4., Physikum, FU Berlin
1971 2.8., Staatsexamen, FU Berlin, Note: gut
1 Jahr Medizinal-Assist.-Zeit an den Krankenhäusern:
Städt. Krhs. Moabit, Innere Abteilg. I, Prof. Bayer
Rudolph-Virchow-Krhs., Kinderklinik:
Innere Abteilg., Prof. Werner
Chirurg. Abteilg., Prof. Haße
In der chirurg. Abteilg. der Kinderklinik Wedding als Assist. bis Juli 1973.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198